Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 2, June. July. 2019, p. 245- 255

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 2، خرداد-تیر 1398، ص. 255-245

بررسی مقدار اسیدهای آلی، ویژگی‌های میکروبی و حسی ماست نوشیدنی پروبیوتیک حاوی گلوکز اکسیداز تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی کیتوزان

مریم عین علی افجه[1]- رضوان پوراحمد[2*]- بهروز اکبری آدرگانی[3]- مهرداد آذین[4]

تاریخ دریافت: 1397/06/01
تاریخ پذیرش: 1397/08/19

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثر افزودن گلوکز اکسیداز تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی کیتوزان بر مقدار اسیدهای آلی (اسید لاکتیک و اسید استیک)، زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک و ویژگی‌های حسی ماست نوشیدنی پروبیوتیک بود. مقادیر مختلف (صفر، 250، 500، 750 و1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم) گلوکز اکسیداز آزاد و تثبیت شده در ماست نوشیدنی پروبیوتیک استفاده شد. نمونه‌ها به مدت سه هفته در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری شدند. طی زمان نگهداری مقدار اسید استیک، جمعیت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ولی مقدار اسید لاکتیک افزایش معنی‌داری داشت (p<0/05). افزودن آنزیم باعث افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در نمونه‌های تست در مقایسه با نمونه شاهد (فاقد آنزیم) شد. زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در نمونه‌های حاوی سطوح بالای آنزیم (750 و 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم) کمتر از سایر سطوح بود. نمونه‌های حاوی 500 میلی‌گرم برکیلوگرم آنزیم آزاد و تثبیت شده بالاترین تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (7/88log CFU/mL) را داشتند و مقدار اسید استیک در این نمونه‌ها بیشتر بود (به‌ترتیب 0/82 و 0/87 g/L). تفاوت معنی‌داری در ویژگی‌های حسی نمونه‌ها مشاهده نشد. بنابراین افزودن گلوکزاکسیداز تثبیت شده بر روی نانو ذرات مغناطیسی کیتوزان می‌تواند با کاهش فشار اکسیداتیو شرایط مطلوب‌تری را برای بقای باکتری‌های پروبیوتیک در ماست نوشیدنی پدید آورد و پذیرش کلی حسی محصول را حفظ نماید ضمن اینکه از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، گلوکز اکسیدازتثبیت شده، ماست نوشیدنی پروبیوتیک، نانوذرات مغناطیسی

مقدمه

امروزه مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک در کشورهای جهان افزایش چشمگیری یافته است و اغلب فرآورده‌های پروبیوتیک موجود در بازار را فرآورده‌های لبنی پروبیوتیک تشکیل می‌دهند (Mohammadi *et al*., 2012). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که پس از مصرف در روده استقرار یافته و از طریق بهبود فلور میکروبی روده، اثرات مفیدی بر سلامتی انسان به‌جا می‌گذارند. رایج‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده در محصولات لبنی شامل گونه‌های جنس *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* می‌باشند (Hussain *et al*., 2009).

فشار اکسیژن برای متابولیسم و زنده‌مانی گونه‌های *بیفیدوباکتریوم*، به دلیل متابولیسم غیرهوازی آنها مضر می‌باشد. تحمل باکتری‌ها در مقابل این فشار به حضور بعضی آنزیم‌ها همچنین تغییرات مورفولوژی و ترکیباتی در سطح سلول‌ها مربوط است (Ruiz *et al*.,2011). برخی محققین تغییرات در آبگریزی سطح و افزایش در مقدار پروتئین در حضور افزایش غلظت اکسیژن را در *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* مشاهده نمودند (Shakirova *et al*., 2010). شرایط هوازی موجب کاهش تولید اگزوپلی‌ساکاریدها در برخی گونه‌های *بیفیدوباکتریوم* از جمله *بیفیدوباکتریوم لانگوم* می‌شود (Ninomiya *et al*., 2009). به‌منظور به حداقل رساندن فشار اکسیداتیو در فرآوری ماست پروبیوتیک، پیشنهاداتی مطرح شده است از جمله اینکه افزودن نیتروژن در طی فرآوری ماست همزمان با افزودن کشت‌ها و متعاقب آن تخمیر در 37 درجه سلسیوس می‌تواند در کاهش مقدار اکسیژن محلول در محصول موثر باشد (Horiuchi *et al*., 2009). همچنین افزدون ترکیباتی به‌منظور به حداقل رساندن

1و 2- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
3- دانشیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
4- دانشیار، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.
(*-نویسنده مسئول Email: rezvanpourahmad@iauvaramin.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v15i2.73767

فشار اکسیژن ناشی از اکسیژن محلول مانند اسید آسکوربیک (Dave and Shah, 1997, 1998)، استفاده از پلی‌استایرن لایه لایه جهت ممانعت از نفوذ گازها (Miller *et al.*, 2003) و ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک (Talwalkar *et al.*, 2004) روش‌های به حداقل رساندن فشار اکسیژن بودند.

علاوه براین اضافه کردن گلوکز اکسیداز به‌عنوان یک راهکار تکنولوژیکی به‌منظور افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک مطرح شده است. گلوکز اکسیداز آنزیمی است که باعث کاتالیز اکسیداسیون بتا- دی گلوکز به مولکول دلتا- گلوکونولاکتون توسط مولکول اکسیژن می‌شود که متعاقب آن باعث هیدرولیز خودبه‌خودی آن به اسید گلوکونیک و پراکسید هیدروژن می‌گردد (Hetch *et al*., 1993). برخی محققین اثر افزودن غلظت‌های مختلف گلوکز اکسیداز را بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبیولوژی ماست پروبیوتیک بررسی کردند. در نمونه‌های ماست حاوی گلوکز اکسیداز آزاد، افزایش کمتر اکسیژن محلول، همراه با کاهش کمتر *بیفیدوباکتریوم لانگوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مشاهده شد (Cruz *et al.*,2012).

تثبیت آنزیم‌ها برروی بسترهای مختلف با اهداف زیادی صورت می‌گیرد که مهمترین آنها عبارتنداز: افزایش پایداری حرارتی آنزیم، افزایش پایداری ساختاری در صورت تماس با محلول‌های آلی، تسهیل در فرآیند جداسازی آنزیم پس از انجام آزمایش، کاهش آلودگی‌های ناشی از آنزیم در محصولات، افزایش سازگاری آنزیم در شرایط زیستی، افزایش فعالیت و راندمان تولید محصول (Sheldon, 2007). تحقیقاتی جهت تثبیت گلوکز اکسیداز بر روی بسترهای آلی و معدنی مختلف توسط برخی محققین صورت گرفته است (Blandino *et al*., 2001; Vikartovská *et al*., 2007). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که نانو ذرات مغناطیسی می‌توانند جایگزین بسیار مناسبی برای بسترهای آلی و معدنی در تثبیت آنزیم‌ها باشند. از مزایای این جایگزینی می‌توان به موارد زیر اشاره نمود (Kim *et al*., 2006; Liu *et al*., 2011):

1- امکان جمع‌آوری ساده، سریع و کم هزینه آنزیم از بافت پیچیده با استفاده از یک میدان مغناطیسی خارجی.

2- ظرفیت بالای بارگذاری آنزیم به‌دلیل سطح ویژه زیاد نانو ذرات.

3- نداشتن محدودیت نفوذ در محلول‌ها و متعاقب آن عدم ایجاد محدودیت در فعالیت آنزیم.

کیتوزان خواص فیزیکی و شیمیایی قابل توجهی دارد که از جمله می‌توان به زیست تخریب پذیر بودن و فعالیت‌های زیستی (فعالیت‌های ضدمیکروبی، هموستاتیک و ضد تومور) اشاره نمود (Denkbas *et al*., 2002; Tang *et al*., 2010). علاوه بر این کیتوزان از لحاظ اقتصادی نیز بسیار مورد توجه است. کیتوزان دارای کاربردهای متعددی است که از جمله می‌توان به تثبیت آنزیم اشاره نمود (Ravi Kumar *et al*., 2000). تاکنون تحقیقی در خصوص تثبیت گلوکز اکسیداز بر روی نانوذرات مغناطیسی و کاربرد آنزیم تثبیت شده در محصولات غذایی صورت نگرفته است. هدف این تحقیق، بررسی اثر گلوکز اکسیداز تثبیت شده روی نانوذرات مغناطیسی کیتوزان بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک، مقدار اسیدهای آلی و ویژگی‌های حسی ماست نوشیدنی پروبیوتیک بوده است.

مواد و روش‌ها

تثبیت آنزیم

نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 طبق روش Ghadi و همکاران (2015) تهیه شد. 0/02 گرم از نانوذرات مغناطیسی در 50 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل گردید سپس 50 میلی‌لیتر محلول تری سدیم سیترات اضافه شد. محلول به‌دست آمده به‌وسیله سونیکاتور به مدت 20 دقیقه همگن شد. 0/3 گرم کیتوزان با وزن مولکولی متوسط و درجه دی استیلاسیون 85% در 100 میلی‌لیتر محلول اسید استیک حل گردید و سپس در 1000 rpm به مدت 25 دقیقه در دمای 20 درجه سلسیوس هم‌زده شد. محلول حاصله همگن شد و pH تا 5 بوسیله افزودن اسید کلریدریک یا هیدروکسید سدیم تنظیم گردید و سپس فیلتر شد (مش 0/2 میکرون). پوشش‌دهی کیتوزان بر روی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بر اساس روش Ghadi و همکاران (2015) انجام گردید. تثبیت آنزیم بر اساس روش Liu و همکاران (2012) همراه با برخی تغییرات صورت گرفت. 480 میکرولیتر گلوتارآلدئید (25% v/v) به 50 میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر شده افزوده شد و 2 میلی‌لیتر محلول نانوذرات مغناطیسی کیتوزان تحت شرایط هم‌زدن شدید اضافه گردید. اضافی گلوتار آلدئید با 5 بار شستن با استفاده از سانتریفوژ (10/000 ×g، 20 دقیقه) خارج شد. بعد از هر بار شستشو میزان جذب در 235 و 280 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر، برای گلوتار آلدئید خوانده شد. محلول در یخ قرار داده شد و 1 میلی‌گرم گلوکز اکسیداز (1/25 Iu/g) در 10 میلی‌لیتر بافر فسفات در pH 7 حل و در یخ قرار داده شد. تحت شرایط هم‌زدن ثابت و 1000 دور در دقیقه، محلول گلوتار آلدئید- نانو ذرات مغناطیسی کیتوزان به محلول آنزیم به‌صورت قطره قطره در طول یک دقیقه اضافه گردید.

بررسی مرفولوژی آنزیم تثبیت شده

برای مطالعه مورفولوژی آنزیم گلوکز اکسیداز بعد از تثبیت، از میکروسکوپ الکترونی روبشی FESEM-edax-map (TESCAN MIRA II, cZECH) استفاده شد. بر روی جانمونه‌ای چسب کربنی و یک تکه فویل آلومینیومی قرار داده شد. به‌منظور آماده‌سازی، نمونه با اتانول با خلوص بالا رقیق شد. بعد از 10 دقیقه سونیکیت شدن 1

میلی‌لیتر از نمونه روی فویل آلومینیومی قرار داده شد و بعد از خشک شدن، داخل دستگاه sputter coater پوشش طلا ایجاد شد. اتصال الکتریکی بین نمونه و جانمونه‌ای ایجاد گردید.

تولید ماست نوشیدنی پروبیوتیک

ماست نوشیدنی با اقتباس از روش Tamime وRobinson (2007) تولید شد. شیر 1/5% چربی استفاده گردید. شیر خشک بدون چربی (2/5% وزنی- حجمی) به شیر اضافه شد. شیر در دمای 85 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه پاستوریزه گردید سپس تا دمای 40 درجه سلسیوس خنک شد. در این دما استارتر DVS پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*La5 و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*BB12) تلقیح گردید. باکتری‌های پروبیوتیک (هرکدام به تعداد 10^8 CFU/mL) همزمان با استارتر DVS ماست (YC-X11) اضافه شدند. گرمخانه‌گذاری در دمای 40 درجه سلسیوس تا رسیدن به pH 4/6 صورت گرفت. سپس محصول تا دمای 10 درجه سلسیوس خنک گردید و ژل با همزدن به مدت 10 دقیقه شکسته شد. گلوکز اکسیداز در طی هم‌زدن اضافه شد به دلیل این که هم‌زدن به‌عنوان آخرین مرحله در فرآیند تولید ماست اکسیژن زیادی را وارد می‌نماید. مقادیر مختلف (صفر، 250، 500، 750 و1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم) گلوکز اکسیداز آزاد و تثبیت شده در ماست نوشیدنی پروبیوتیک استفاده شد. در واقع تیمارها شامل 8 تیمار تست (4 تیمار حاوی مقادیر فوق الذکر آنزیم آزاد به‌علاوه 4 تیمار حاوی مقادیر مذکور آنزیم تثبیت شده) و یک تیمار شاهد (فاقد آنزیم) بودند. نمونه‌های ماست نوشیدنی در ظروف پلی‌پروپیلن به حجم 100 میلی لیتر بسته‌بندی و به مدت 21 روز در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. نمونه‌ها از نظر شمارش باکتری‌های پروبیوتیک، مقادیر اسید لاکتیک و اسید استیک، و ویژگی‌های حسی بررسی شدند.

شمارش باکتری‌های پروبیوتیک

برای شمارش باکتری‌های پروبیوتیک محیط کشت اختصاصیMRS-bile agar استفاده شد. گرمخانه‌گذاری در دمای 37 درجه سلسیوس و مدت زمان 72 ساعت در شرایط هوازی و بی‌هوازی صورت گرفت(Sabooni *et al.*, 2018).

اندازه‌گیری اسیدهای آلی

اسید لاکتیک و اسید استیک با استفاده از HPLC (HPLC P680, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) اندازه‌گیری شدند. ستون مورد استفاده Aminex HPX-87H (300× 7-8 mm) بود. اسید سولفوریک رقیق (0/005 mol/L) به‌عنوان فاز متحرک با جریان ثابت (0/6 mL/min) استفاده شد. 5 گرم از ماست به 35 mL اسید سولفوریک 0/005 mol/L اضافه شد و به مدت 10 دقیقه در 4 درجه سلسیوس در 5000 دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی قبل از آنالیز کروماتوگرافی با غشاء پلی‌کربنات 0/45 میکرومتر صاف شد. اسیدهای آلی در mL/min 0/6 در دمای 65 سلسیوس جدا شدند (Donkor *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2009).

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی توسط 10 نفر ارزیاب آموزش دیده با استفاده از روش هدونیک 5 نقطه‌ای صورت پذیرفت. پارامترهای طعم، بافت و پذیرش کلی ارزیابی شدند (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1387).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. تیمارها با سه تکرار بررسی شدند. از آنالیز واریانس و آزمون دانکن در سطح اطمینان 95% برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد. نرم‌افزار SPSS 22 استفاده گردید.

نتایج و بحث

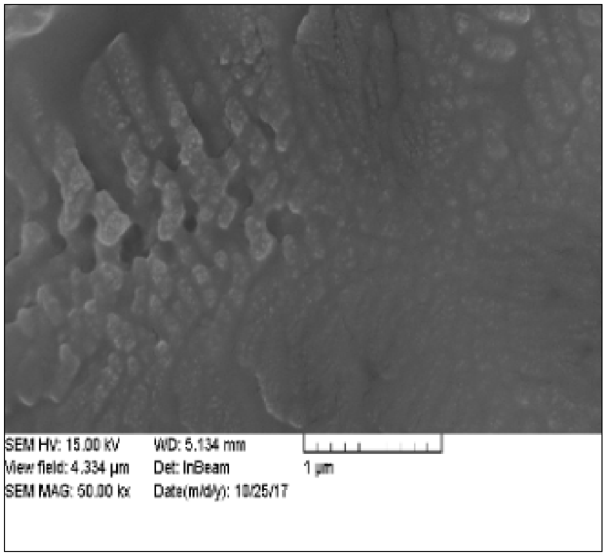
مورفولوژی آنزیم تثبیت شده

مورفولوژی سطح نانو ذرات مغناطیسی کیتوزان بعد از تثبیت گلوکز اکسیداز به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مشاهده گردید (شکل 1). در این شکل مورفولوژی ذرات و توپوگرافی یکنواخت سطح ذرات به وضوح نشان داده شده است. براین اساس گلوکز اکسیداز به شکل یکنواخت بر روی سطح نانو ذرات مغناطیسی توزیع شده است. نتایج این بررسی در مقایسه با تصاویر میکروسکوپی پیش از تثبیت آنزیم، حاکی از تثبیت موفقیت‌آمیز آنزیم بر روی نانو ذرات مغناطیسی کیتوزان می‌باشد. نتایج این تحقیق با یافته‌های Kaushik و همکاران (2008) مطابقت دارد.

زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

با توجه به جدول1 مشخص گردید که در روز اول نگهداری کمترین شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* متعلق به نمونه شاهد و FE_{250} (نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد) بود (به‌ترتیب 7/8 و 7/94 logCFU/mL). IE_{1000} (نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم تثبیت شده)، IE_{500} (نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم تثبیت شده) و IE_{750} (نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم تثبیت شده) بیشترین جمعیت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را داشتند (به‌ترتیب log CFU/mL 8/4، 8/37 و 8/36). در روز 11ام نگهداری کمترین شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* متعلق به نمونه شاهد بود

(6/97 log CFU/mL) و IE_{1000} بیشترین شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را داشت (8/40log CFU/mL). در روز 21ام نگهداری کمترین شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* متعلق به نمونه شاهد و FE_{250} بود (به‌ترتیب 5/95 و 6/11 log CFU/mL) و IE_{1000} بیشترین تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را به‌خود اختصاص داد (8/33log CFU/mL). با افزایش زمان نگهداری، تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$).



شکل 1- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی برای گلوکز اکسیداز تثبیت شده بر نانو ذرات مغناطیسی کیتوزان

جدول1- تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (log CFU/mL) در نمونه‌های ماست نوشیدنی طی نگهداری

تیمار	روز 1	روز 11	روز 21
Control	7/80±0/08 Ac	6/97±0/09 Bh	5/95±0/15 Cd
FE_{250}	7/94±0/08 Abc	7/40±0/09 Bg	6/11±0/08 Ccd
FE_{500}	8/04±0/07 Ab	8/05±0/08 Ac	7/68±0/09 Bb
FE_{750}	8/00±0/08 Ab	7/94±0/09 Ae	6/24±0/08 Cc
FE_{1000}	8/05±0/12 Ab	7/97±0/05 Ad	6/29±0/10 Cc
IE_{250}	8/02±0/11 Ab	7/61±0/07 Bf	6/28±0/07 Cc
IE_{500}	8/37±0/08 Aa	8/35±0/07 Ab	7/95±0/08 Bb
IE_{750}	8/36±0/10 Aa	8/35±0/09 Ab	7/98±0/10 Bb
IE_{1000}	8/40±0/07 Aa	8/40±0/08 Aa	8/33±0/50 Ba

* حروف بزرگ غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطر است ($p\leq0/05$)، حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در ستون است ($p\leq0/05$). FE_{250}: نمونه حاوی250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{500} : نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{750}: نمونه حاوی 700 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، IE_{250}: نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{750}: نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، Control : شاهد (بدون آنزیم).

با توجه به جدول2 مشخص گردید که در روز اول، کمترین تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* مربوط به نمونه شاهد بود (7/50 logCFU/mL)، و IE_{500} و FE_{500} بیشترین شمارش را داشتند (7/88 logCFU/mL). در روز یازدهم، کمترین شمارش *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* مربوط به نمونه شاهد بود (6/90 logCFU/mL) و IE_{500}، FE_{500} و IE_{750} بیشترین جمعیت

باکتری را داشتند (7/72 logCFU/mL). در روز بیست و یکم، کمترین تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در نمونه شاهد مشاهده شد (6/21 logCFU/mL) و بیشترین تعداد این باکتری مربوط به IE_{500} و FE_{500} بود (7/70 logCFU/mL). تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* طی دوره نگهداری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0/05$).

جدول 2- تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (log CFU/mL) در نمونه‌های ماست نوشیدنی طی نگهداری

تیمار	روز 1	روز 11	روز 21
Control	$7/50 \pm 0/07^{gA}$	$6/90 \pm 0/08^{fB}$	$6/21 \pm 0/09^{hC}$
FE250	$7/70 \pm 0/08^{cA}$	$7/61 \pm 0/09^{bA}$	$7/45 \pm 0/07^{cB}$
FE500	$7/88 \pm 0/05^{aA}$	$7/72 \pm 0/07^{aB}$	$7/70 \pm 0/09^{aC}$
FE750	$7/63 \pm 0/08^{dA}$	$7/61 \pm 0/11^{bA}$	$6/52 \pm 0/08^{eB}$
FE1000	$7/41 \pm 0/12^{hA}$	$7/22 \pm 0/09^{cA}$	$6/51 \pm 0/07^{fB}$
IE250	$7/51 \pm 0/10^{fA}$	$6/93 \pm 0/10^{eB}$	$6/21 \pm 0/07^{gB}$
IE500	$7/87 \pm 0/11^{aA}$	$7/72 \pm 0/11^{aB}$	$7/70 \pm 0/10^{aB}$
IE750	$7/79 \pm 0/09^{bA}$	$7/72 \pm 0/07^{aA}$	$7/69 \pm 0/09^{bB}$
IE1000	$7/52 \pm 0/09^{eA}$	$7/11 \pm 0/08^{dB}$	$6/64 \pm 0/19^{dC}$

* حروف بزرگ غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطر است ($p \leq 0/05$)، حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در ستون است ($p \leq 0/05$).
FE_{250}: نمونه حاوی250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد ، FE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{750}:نمونه حاوی 700 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، IE_{250}: نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{750}: نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، Control : شاهد (بدون آنزیم).

نتایج این تحقیق نشان داد افزودن گلوکز اکسیداز اثر مثبتی در کاهش اکسیژن محلول و افزایش زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در ماست نوشیدنی پروبیوتیک دارد که با تحقیقات پیشین مطابقت دارد (Cruz *et al.*, 2012). افزودن گلوکز اکسیداز یک روش زیست فناوری است و می‌تواند مورد قبول صنایع غذایی مدرن باشد که نظر منفی نسبت به استفاده از مواد شیمیایی در مواد غذایی دارند (Behrens *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2012; Shim *et al.*, 2011).

به‌نظر می‌رسد بالاتر بودن زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نمونه‌های با سطوح کم و متوسط آنزیم تثبیت شده (IE_{250}, IE_{500}) نسبت به آنزیم آزاد به دلیل افزایش فعالیت آنزیم تثبیت شده در pH ماست باشد. در غلظت‌های بالاتر (IE_{750}, IE_{1000}) اثر کیتوزان محسوس‌تر خواهد بود چرا که سوبسترای لازم برای فعالیت آنزیم محدود بوده و به‌نظر می‌رسد در غلظت‌های بالاتر کیتوزان نقش سینرژیستی با آنزیم داشته است. کیتوزان به‌عنوان پری‌بیوتیک قادر است سبب تحریک رشد باکتری‌های پروبیوتیک شود (ارباب سلیمانی و همکاران، 1395).

افزودن گلوکز اکسیداز تثبیت شده بر روی نانو ذرات مغناطیسی کیتوزان اثر مثبت بیشتری در کاهش فشار اکسیداتیو در ماست نوشیدنی پروبیوتیک نسبت به نمونه شاهد و نمونه‌های با آنزیم آزاد داشت که در نتیجه شرایط مطلوب‌تری را برای توسعه میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک پدید آورد که ذاتا غیرهوازی یا میکروآئروفیل هستند.

اسیدهای آلی

با توجه به جدول 3 مشخص گردید که در روز اول نگهداری کمترین مقدار اسیدلاکتیک متعلق به نمونه‌های FE_{500} (نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد) و FE_{1000} (نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد) بود (به‌ترتیب 8/19 و 8/29 g/L). FE_{750} (نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد) بیشترین مقدار اسیدلاکتیک را داشت (8/49 g/L). در روز11ام نگهداری کمترین اسیدلاکتیک مربوط بهIE_{250} (نمونه حاوی 250 آنزیم تثبیت شده) و FE_{500} بود (به‌ترتیب 8/28 و 8/32 g/L). نمونه شاهد و FE_{1000} بیشترین اسیدلاکتیک را داشتند (به‌ترتیب 9/10 و 9/12 g/L). در روز 21 ام نگهداری کمترین مقدار اسیدلاکتیک متعلق به IE_{750} (نمونه حاوی 750 آنزیم تثبیت شده) بود (8/92 g/L). نمونه شاهد، FE_{1000} وFE_{750} بیشترین مقدار اسیدلاکتیک را داشتند (به‌ترتیب 9/14 ، 9/16 و 9/13 g/L). طی زمان نگهداری، مقدار اسیدلاکتیک در نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0/05$).

جدول3- مقادیر اسید لاکتیک (g/L) در نمونه‌های ماست نوشیدنی طی نگهداری

تیمار	روز 1	روز 11	روز 21
Control	$8/32\pm0/02^{Cb}$	$9/10\pm0/02^{Ba}$	$9/14\pm0/01^{Aa}$
FE_{250}	$8/29\pm0/03^{Cb}$	$8/87\pm0/02^{Bc}$	$9/09\pm0/02^{Ab}$
FE_{500}	$8/19\pm0/02^{Cd}$	$8/32\pm0/02^{Bf}$	$8/98\pm0/03^{Ad}$
FE_{750}	$8/49\pm0/03^{Ca}$	$8/97\pm0/02^{Bb}$	$9/13\pm0/02^{Aa}$
FE_{1000}	$8/22\pm0/03^{Bcd}$	$9/12\pm0/01^{Ba}$	$9/16\pm0/01^{Aa}$
IE_{250}	$8/24\pm0/00^{Cc}$	$8/28\pm0/13^{Bf}$	$9/05\pm0/00^{Ac}$
IE_{500}	$8/29\pm0/01^{Cb}$	$8/47\pm0/01^{Be}$	$9/04\pm0/02^{Ac}$
IE_{750}	$8/31\pm0/01^{Cb}$	$8/49\pm0/01^{Be}$	$8/92\pm0/01^{Ae}$
IE_{1000}	$8/29\pm0/00^{Cb}$	$8/59\pm0/02^{Bd}$	$9/04\pm0/00^{Ac}$

* حروف بزرگ غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطر است ($p\leq0/05$)، حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در ستون است ($p\leq0/05$).
FE_{250}: نمونه حاوی250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{500} : نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{750} :نمونه حاوی 700 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، IE_{250}: نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{750}: نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، Control : شاهد (بدون آنزیم).

اسید لاکتیک نقش ویژه‌ای در ویژگی‌های عطر و طعم و رایحه ماست ایفا می‌کند. در طی تولید ماست حدود 20-40% لاکتوز موجود در شیر به اسید لاکتیک تبدیل می‌شود و مقدار اسید لاکتیک حدود 0/9 % است. در طول نگهداری کاهش غلظت لاکتوز، با افزایش غلظت اسید لاکتیک همراه است. زمانی که شیر تا 14% ماده خشک استاندارد می‌شود ماست بعد از تخمیر حاوی 5 -4 گرم لاکتوز در 100 میلی‌لیتر است (Tamime and Robinson, 2007). برخی محققان اثر افزودن گلوکز اکسیداز را در ماست پروبیوتیک بررسی و افزایش اسیدهای چرب چند غیراشباعی و مقادیر مشابه اسید لاکتیک را گزارش کردند (Batista *et al*., 2015)

با توجه به جدول4 مشخص گردید که در روز اول نگهداری کمترین مقدار اسید استیک متعلق به IE_{250} (نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم تثبیت شده) بود (0/71 g/L) و IE_{500} (نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم تثبیت شده) بیشترین مقدار اسید استیک را داشت (0/87 g/L). در روز 11م نگهداری کمترین مقدار اسید استیک متعلق به تیمار شاهد بود (0/65 g/L)که با IE_{500}، FE_{250}، FE_{500} و IE_{750} اختلاف معنی‌دار داشت ($p\leq0/05$). تیمار IE_{500} بیشترین مقدار اسید استیک را به‌خود اختصاص داد (0/91 g/L) که با نمونه شاهد، IE_{250} و FE_{750} اختلاف معنی‌دار داشت ($p\leq0/05$). در روز21ام نگهداری کمترین مقدار اسید استیک متعلق به تیمار شاهد و IE_{250} بود (به‌ترتیب 0/53 و 0/54 g/L)که با IE_{500} و IE_{750} اختلاف معنی‌دار داشت ($p\leq0/05$). IE_{750} (نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم تثبیت شده) و IE_{500} (نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم تثبیت شده) بیشترین مقدار اسید استیک را به‌خود اختصاص داد (به‌ترتیب 0/77 و 0/76 g/L) که با نمونه شاهد و IE_{250} اختلاف معنی‌دار داشت ($p\leq0/05$). طی زمان نگهداری، مقدار اسید استیک در نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq0/05$).

در نمونه‌های دارای تعداد بالاتر *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، یعنی نمونه‌های تهیه شده با غلظت‌های 500 و 750 میلی‌گرم آنزیم تثبیت شده (IE_{500} و IE_{750}) و نیز غلظت 500 میلی‌گرم آنزیم آزاد (FE_{500}) مقدار استیک اسید بیشتر بود. نتایج تحقیق حاضر مطابق با یافته‌های محققین دیگر می‌باشد که گزارش نمودند مقادیر بالای استیک اسید در ماست عموما از طریق مسیر هتروفرمانتاتیو لاکتوز، توسط گونه‌های *بیفیدوباکتریوم* ایجاد می‌شود (Venica *et al.*, 2014). برخی محققان نیز افزایش مشخص در مقدار اسید استیک را در شیرهای تخمیری و ماست با افزودن باکتری‌های پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *بیفیدوباکتریوم لانگوم* و *بیفیدوباکتریوم ایفانتیس*) گزارش کردند (La Torre *et al.*, 2003). عده‌ای از محققین نیز سطوح قابل قیاس اسید استیک در ماست سنتی و ماست تهیه شده با افزودن *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB12 را طی دوره نگهداری نشان دادند (Settachaimongkon *et al.*, 2014).

ویژگی‌های حسی

طبق جدول 5، نمونه‌های تست و شاهد از نظر طعم تفاوت معنی‌داری نداشتند. طی زمان نگهداری، امتیاز طعم کلیه نمونه‌ها (تست و شاهد) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq0/05$).

نتایج ارزیابی حسی پارامتر بافت در جدول 6 نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های تست و شاهد از نظر پارامتر حسی بافت مشاهده نشد. با افزایش زمان ماندگاری از روز اول تا 21 ام نگهداری ، میانگین امتیازات بافت کلیه نمونه‌ها (تست و شاهد) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq0/05$).

جدول 4- مقادیر اسید استیک (g/L) در نمونه‌های ماست نوشیدنی طی نگهداری

تیمار	روز 1	روز 11	روز 21
Control	0/75±0/06^{abA}	0/65±0/06^{cB}	0/53±0/06^{bC}
FE_{250}	0/79±0/07^{abA}	0/83±0/10^{abA}	0/66±0/06^{abB}
FE_{500}	0/82±0/09^{abA}	0/89±0/04^{abA}	0/62±0/11^{abB}
FE_{750}	0/74±0/06^{abA}	0/75±0/06^{bcA}	0/65±0/13^{abB}
FE_{1000}	0/77±0/07^{abA}	0/79±0/10^{abcA}	0/63±0/04^{abB}
IE_{250}	0/71±0/05^{bA}	0/75±0/08^{bcA}	0/54±0/04^{bB}
IE_{500}	0/87±0/08^{aA}	0/91±0/06^{aA}	0/76±0/06^{aB}
IE_{750}	0/84±0/10^{abA}	0/84±0/10^{abA}	0/77±0/06^{aB}
IE_{1000}	0/73±0/07^{abA}	0/77±0/07^{abcA}	0/63±0/07^{abB}

* حروف بزرگ غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطر است ($p\leq0/05$)، حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در ستون است ($p\leq0/05$). FE_{250}: نمونه حاوی250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{750}: نمونه حاوی 700 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، IE_{250}: نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{750}: نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، Control : شاهد (بدون آنزیم).

جدول 5- امتیاز طعم نمونه‌های ماست نوشیدنی طی نگهداری

تیمار	روز 1	روز 11	روز 21
Control	4/50±1/08^{aA}	3/70±1/05^{aB}	3/50±1/35^{aC}
FE_{250}	4/30±1/16^{aA}	3/50±1/08^{aB}	3/30±1/33^{aC}
FE_{500}	4/10±0/73^{aA}	3/30±1/16^{aB}	3/30±1/05^{aB}
FE_{750}	4/00±1/15^{aA}	3/30±1/16^{aB}	3/30±0/82^{aB}
FE_{1000}	3/90±1/10^{aA}	3/20±1/03^{aB}	3/10±1/19^{aC}
IE_{250}	4/10±1/28^{aA}	3/30±1/05^{aB}	3/30±1/16^{aB}
IE_{500}	4/00±1/63^{aA}	3/50±1/17^{aB}	3/40±1/07^{aC}
IE_{750}	3/80±0/91^{aA}	3/40±0/84^{aB}	3/30±0/67^{aC}
IE_{1000}	3/80±0/91^{aA}	3/20±1/47^{aB}	3/10±1/10^{aC}

* حروف بزرگ غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطر است ($p\leq0/05$)، حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در ستون است ($p\leq0/05$). FE_{250}: نمونه حاوی250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{750} :نمونه حاوی 700 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، IE_{250}: نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{750}: نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، Control : شاهد (بدون آنزیم).

مطابق با جدول 7، تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های تست و شاهد از نظر پذیرش کلی مشاهده نشد. با افزایش زمان نگهداری از روز اول تا روز 21 ام، امتیاز پذیرش کلی کلیه نمونه‌ها (تست و شاهد) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq0/05$). نتایج نشان داد که افزودن گلوکزاکسیداز بر پذیرش کلی حسی ماست نوشیدنی پروبیوتیک اثری نداشت که مطابق با تحقیقات پیشین بود (Cruz *et al.*, 2011). به

عبارتی ماست حاوی گلوکز اکسیداز آزاد و تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی کیتوزان مقبولیت پایین‌تری از نظر ویژگی‌های حسی نسبت به نمونه شاهد نشان نداد. شایان ذکر است که افزودن کشت‌های پروبیوتیک به مواد غذایی مانند ماست، نباید اثر منفی بر کیفیت حسی آنها داشته باشد (Cruz *et al.*, 2010). یافته‌های برخی محققین این مسئله را تایید کردکه کیفیت حسی ماست‌های پروبیوتیک/ پری‌بیوتیک مشابه و یا حتی بهتر از انواع معمولی آنهاست (Allgeyer *et al.*, 2010; Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2011)

جدول 6- امتیاز بافت نمونه‌های ماست نوشیدنی طی نگهداری

تیمار	روز 1	روز 11	روز 21
Control	4/80±0/63[aA]	4/50±0/85[aB]	3/80±1/61[aC]
FE_{250}	4/60±0/84[aA]	4/60±0/69[aA]	3/80±1/93[aB]
FE_{500}	4/50±1/26[aA]	4/60±1/26[aB]	3/80±1/75[aC]
FE_{750}	4/70±0/94[aA]	4/60±0/84[aA]	3/80±1/47[aB]
FE_{1000}	4/70±0/67[aA]	4/50±1/08[aB]	3/80±1/54[aC]
IE_{250}	4/60±0/84[aA]	4/60±1/26[aA]	3/90±0/99[aB]
IE_{500}	4/70±0/67[aA]	4/50±1/26[aB]	3/90±0/87[aC]
IE_{750}	4/50±0/85[aA]	4/60±0/96[aA]	3/90±0/99[aB]
IE_{1000}	4/50±0/70[aA]	4/60±0/69[aA]	3/90±1/37[aB]

* حروف بزرگ غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطر است ($p\leq0/05$)، حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در ستون است ($p\leq0/05$). FE_{250}: نمونه حاوی250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد ، FE_{500} : نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{750} :نمونه حاوی 700 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{1000} نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، IE_{250}: نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{750}: نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، Control : شاهد (بدون آنزیم).

جدول 7- امتیاز پذیرش کلی نمونه‌های ماست نوشیدنی طی نگهداری

تیمار	روز 1	روز 11	روز 21
C	4/00±1/05[aA]	3/90±1/44[aB]	3/80±1/61[aC]
FE_{250}	4/20±1/31[aA]	3/80±1/31[aB]	3/30±1/41[aC]
FE_{500}	4/00±1/33[aA]	3/60±1/17[aB]	3/60±1/83[aB]
FE_{750}	3/80±1/13[aA]	3/50±1/05[aB]	3/30±1/05[aC]
FE_{1000}	3/70±0/94[aA]	3/50±1/26[aB]	3/60±1/50[aC]
IE_{250}	4/20±1/13[aA]	3/80±0/91[aB]	3/40±1/17[aC]
IE_{500}	4/00±0/66[aA]	4/00±0/81[aA]	3/40±1/35[aB]
IE_{750}	3/90±0/99[aA]	3/60±0/84[aB]	3/60±1/17[aB]
IE_{1000}	3/90±0/99[aA]	3/60±1/07[aB]	3/40±1/07[aC]

* حروف بزرگ غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطر است ($p\leq0/05$)، حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در ستون است ($p\leq0/05$). FE_{250}: نمونه حاوی250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد ، FE_{500} : نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{750} :نمونه حاوی 700 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، FE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز آزاد، IE_{250} : نمونه حاوی 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{500}: نمونه حاوی 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{750}: نمونه حاوی 750 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، IE_{1000}: نمونه حاوی 1000 میلی‌گرم بر کیلوگرم گلوکز اکسیداز تثبیت شده، Control : شاهد (بدون آنزیم).

نتیجه‌گیری

می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از گلوکز اکسیداز تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی کیتوزان با کاهش فشار اکسیداتیو ناشی از اکسیژن محلول شرایط مطلوب‌تری را برای توسعه میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در ماست نوشیدنی پروبیوتیک پدید می‌آورد بدون آنکه مقبولیت حسی محصول را کاهش دهد. این روش (افزودن آنزیم تثبیت شده) می‌تواند در ماست نوشیدنی پروبیوتیک کاربردی باشد زیرا بازیابی آنزیم سریع و آسان است ضمن اینکه این روش ایمن بوده و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه می‌باشد.

منابع

ارباب سلیمانی، ن.، کسری کرمانشاهی، ر.، یخچالی، ب.، 1395، تأثیر پری‌بیوتیک کیتوزان بر رشد و خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی. مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران، 10، 43-35.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1387، روش‌های آزمون حسی، استاندارد ملی ایران شماره 3442.

Allgeyer, L.C., Miller, M.J., Lee, S.Y., 2010, Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *Journal of Dairy Science*, 93, 4471–4479.

Batista, A.L.D., Silva, R., Cappato, L.P. Almada, C.N., Garcia, R.K.A., Silva, M.C., Raices, R.S.L., Arellano, D.B., SantAna, A.S., Conte Junior, C.A., Freitas, M.Q., Cruz, A.G., 2015, Quality parameters of probiotic yogurt added of glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical-chemical and metabolic activity analysis. *Food Research International Journal*, 77(3), 627-635

Behrens, J. H., Barcellos, M. N., Frewer, L. J., Nunes, T. P., G. M. Franco, B. D., Destro, M. T., Landgraf, M., 2010, Consumer purchase habits and views on food safety: A Brazilian study. *Food Control*, 21, 963–969.

Blandino A., Macias M., Cantero D., 2001, Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 36, 601- 606.

Cruz, A. G., Faria , J. A. F., Walter, E. H. M., Andrade, R. R., Cavalcanti, R. N., Oliveira, C. A. F., Granato, D., 2010, Optimization of the processing of probiotic yoghurt added with glucose oxidase using the response surface methodology. *Journal of Dairy Science*, 93, 1058–1069.

Cruz, A. G., Faria , J. A. F., Faria, G. A. F., Oliveira, C. A. F., Cavalcani, R. N., Bona, E., Bolini, H. A. M., Silva, M. A. A. P. D., 2011, Consumer acceptability and purchase intent of probiotic yogurt added glucose oxidase using sensometrics, artificial neural networks and logistic regression. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 549- 556.

Cruz , A. G., Castro, W. F., Faria , J. A. F., Lollo, P. C. B., Amaya-Farfán , J., Freitas , M. Q., Rodrigues, D., Oliveira, C. A. F., Godoy, H. T., 2012, Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *Journal of Dairy Science*, 95, 2261–2269

Dave, R. I., Shah, N.P., 1997, Effectiveness of acid ascorbic as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yogurts made with commercial starters cultures. *International Dairy Journal*, 7, 435-443.

Dave, R. I., Shah, N.P., 1998, Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81, 2804–2816.

Denkbas. E. B., Kilicay, Birlikseven, C., Ozturk, E., 2002, *Reactive and Functional Polymers*, 50, 225-232.

Donkor, O. N., Henriksson, A.,Vasiljevic, T., Shah, N. P., 2005, Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. *Journal of Food Science*, 70, M375–M381.

Ghadi, A., Tabandeh, F., Mahjoub, S., Mohsenifar, A., Talebnia Roshan, F., Shafiee Alavije, R., 2015, Fabrication and characterization of core- shell magnetic chitosan nanoparticles as a novel carrier for immoblization of Burkholderia cepacia lipase. *Journal of oleo Science*, 64 (4), 423- 430.

Gonzalez-Gonzalez, C.R., Tuohy, K.M., Jauregi, P., 2011, Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACEinhibitory activity. *International Dairy Journal*, 21, 615-622.

Hetch, H. J., Kalisz, H, M., Hendle, J., Schmid, R. D., 1993, Crystal structure of glucose oxidase from Aspergillus niger refined at 2.3 A resolution. *Journal of Molecular Biology*, 229, 153- 172.

Horiuchi, H., Inoue, N., Liu, E., Fukui, M., Sasaki, Y., Sasaki, T., 2009, A method for manufacturing superior set yogurt under reduced oxygen conditions. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4112-4121.

Hussain, I., Rahman, A.U., Atkinson, N., 2009, Quality comparison of probiotic and natural yogurt. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8, 9-12.

Kaushik, A., Khan, R., Solanki, P.R., Pandey, P., Alam, J., Ahmad, S., Malhotra, B.D., 2008, Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor. *Biosens Bioelectron*, 24, 676-683.

Kim, J., Grate, J.W., Wang, P., 2006, Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Journal*, 61, 1017-26.

La Torre, L., Tamime, A.Y., Muir, D.D., 2003, Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. *International Journal of Dairy Technology*, 56,163–170

Liu, X., Lei, L., Li, Y., Zhu, H., Cui, Y., Hu, H., 2011, Preparation of carriers based on magnetic nanoparticles grafted polymer and immobilization for lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 56, 142-49.

Liu, L.H., Zhao, G., He, B., Chen, L., Huang, L., 2012, Immobilization of pectinase and lipase on macroporous resin coated with chitosan for treatment of whitewater from papermaking. *Bioresource Technology*, 123, 616-619.

Miller, C. W., Nguyen, M. H., Rooney, M., Kailasapathy, K., 2003, the control of dissolved oxygen content in probiotic yoghurts by alternative packaging materials. *Packaging Technology and Science*, 16, 61–67.

Mohammadi, R., Sohrabvandi, S. and Mortazavian, A.M., 2012, the starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milk. *Engineering in Life Sciences*, 12 (4), 399-409.

Ninomiya, K., Matsuda, K., Kawahata, T., Kanaya, T., Kohno, M., Katakura, Y., Asada, M., Shioya, S., 2009, Effect of the CO2 concentration on the growth and exopolysaccharide production of *Bifidobacteriumlongum* cultived under aerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 5, 535–537.

Ravi Kumar, M.N.V., 2000, A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers, 46(1), 1-27.

Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Guiemonde, M., Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A., Sanchez, B., 2011, How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes and Nutrition*, 6, 307–318.

Sabooni, P., Pourahmad, R., Mahdavi Adeli, H.R., 2018, Improvement of Viability of Probiotic Bacteria, Organoleptic Qualities and Physical Characteristics in Kefir Using Transglutaminase and Xanthan. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 17(2), 141–148.

Settachaimongkon, S., Nout, R.M.J., Antunes Fernandes, E.C., van Hooijdonk, T.C.M., Zwietering, M.H., Smid, E.J., van Valenberg, H.J.F., 2014, The impact of selected strains of probiotic bacteria on metabolite formation in set yoghurt. *International Dairy Journal*, 38, 1–10

Serra, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., Ferragut, V., 2009, Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, 19(2), 100-106.

Shakirova, L., L. Auzina, P. Zikmanis, M. Gavare, and M. Grube., 2010, Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillusacidophilus* and *Bifidobacterium lactis* cells and characteristics by FT-IS spectra. *Spectroscopy International Journal*, 24, 251–255.

Sheldon, R.A., 2007, Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced *Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289 307.

Shim, S.M.,Seo, S.H., Lee, Y., Gui-Im, M, Min-Shik, K., Park, J.H., 2011, Consumers' knowledge and safety perceptions of food additives: Evaluation on the effectiveness of transmitting information on preservatives. *Food Control*, 22, 1054–1060.

Talwalkar, A., Kailasapathy, K., 2004, Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillu sacidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yogurts. *International Dairy Journal*, 14, 143-149.

Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 2007, Yoghurt science and technology, CRC Press, Boca Raton,
pp.13-161.

Tang, H., Zhang, P., Kieft, T., Ryon, S., Baker, S., Wiesman, W., Rogelji, S., 2010, Antibacterial action of anoval functionalized chitosan arginine against gram-negative bacteria. *Acta Biomaterialia*, 6, 2562- 2571.

Venica, C., Perotti, M., Bergamini, C., 2014, Organic acids profiles in lactose- hydrolyzed yogurt with different matrix composition. *Dairy Science and Technology*, 94, 561-580.

Vikartovská, D., Pätoprsty, V., Lacík, I., Gemeiner, P., 2007, Improvement of the stability of glucose oxidase via encapsulation in sodium alginate- cellulose sulfate- poly (methylene- co- guanidine) capsules. *Enzyme Microb Technology*, 41, 748-755.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 2, June. July. 2019, p. 245- 255

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 2، خرداد-تیر 1398 ص. 255-245

Investigation of the organic acids, microbial and sensory properties of probiotic drinking yogurt containing glucose oxidase immobilized on magnetic chitosan nanoparticles

M. Ein Ali Afjeh[1], R. Pourahmad[2*], B. Akbari Adergani[3], M. Azin[4]

Received: 2018.08.22
Accepted: 2018.11.19

Introduction: The aim of this study was to investigate the effect of immobilized glucose oxidase on magnetic chitosan nanoparticles on the content of organic acids (lactic acid and acetic acid), viability of probiotic bacteria and sensory properties of probiotic drinking yogurt.

Materials and methods: Different concentrations (0, 250, 500, 750 and 1000 mg/kg) of free and immobilized glucose oxidase were used in probiotic drinking yogurt. The samples were stored at 4˚C for three weeks.

Results and discussion: During storage, the content of acetic acid, counts of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* decreased and the content of lactic acid increased significantly ($p<0.05$). Addition of enzyme increased the viability of probiotic bacteria in test samples as compared to control sample (without enzyme). The viability of *Bifidobacterium lactis* in the samples containing high levels of enzyme (750 and 1000 mg/kg) was higher than other levels. The samples containing 500 mg/kg of free and immobilized enzyme had the highest count of *Bifidobacterium lactis* (7.88 log CFU/mL) and the amount of acetic acid in these samples (0.82 and 0.87 g/L, respectively) was more than other samples. There was no significant difference between the samples in regards to sensory properties. Therefore, addition of glucose oxidase immobilized on magnetic chitosan nanoparticles can decrease oxidative pressure and create suitable condition for the viability of probiotic bacteria in drinking yogurt and maintain overall acceptability. Moreover, it is economically feasible**.**

Keywords: Chitosan, Immobilized glucose oxidase, Magnetic nanoparticles, Probiotic drinking yogurt

1 and 2. Ph.D. Student and Associate Professor respectively, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

3. Associate Professor, Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.
4. Associate Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
(*Corresponding author's Email: rezvanpourahmad@iauvaramin.ac.ir)